

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/096551 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01J 13/02,
A61K 8/11, 9/50, 9/51, C11D 3/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06001

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Mai 2002 (31.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 27 526.9 31. Mai 2001 (31.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, Halle
06120 (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PANZNER, Steffen
[DE/DE]; Blumenstrasse 9, Halle 06108 (DE).

(74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; PATEN-
TANWÄLTE GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG,
SCHÜTZENSTRASSE 15 - 17, 10117 BERLIN (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DISSOLVABLE NANOCAPSULES AND MICROCAPSULES, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND
THEIR USE

(54) Bezeichnung: AUFLÖSBARE NANO- UND MIKROKAPSELN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE IHRE
VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to rapidly dissolvable nanocapsules and microcapsules, to a method for the production thereof
and to the use of the nanocapsules and microcapsules in the field of diagnostics and therapy. The invention provides dissolvable
nanocapsules and microcapsules, which comprise a colloidal template in an aqueous solution, and complementary charged polymers
on the template, whereby at least one of the polymers is a polyampholyte that can be discharged or whose charge can be reversed by
changing the pH value.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft schnell auflösbare Nano- und Mikrokapseln, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie
die Verwendung der Nano- und Mikrokapseln in Diagnostik und Therapie. Es werden auflösbare Nano- oder Mikrokapseln vorge-
schlagen, die ein kolloidales Templat in wässriger Lösung und komplementär geladene Polymere auf dem Templat umfassen, wobei
mindestens eines der Polymere ein Polyampholyt ist, welcher durch eine pH-Wertänderung ent- oder umladbar ist.

WO 02/096551 A1

Auflösbare Nano- und Mikrokapseln, Verfahren zu ihrer
Herstellung sowie ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft auflösbare Nano- und Mikrokapseln,
Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der Nano-
und Mikrokapseln zur Verpackung und Freisetzung von
Wirkstoffen.

Bekannte Nanokapseln aus Polymeren können nach verschiedenen
Verfahren hergestellt werden, wobei die Herstellung der
Nanokapseln ihre Charakteristik - wie Stabilität, oder
Auflöseverhalten - mit bestimmt. So sind beispielsweise
mehrere templatbasierte Herstellungsmethoden bekannt, bei
denen bereits vorhandene Partikel wie Latizes, Liposomen oder
Emulsionen mit einer in sich stabilen Hüllschicht überzogen
werden. Solche Partikel werden in der DE 198 12 083,
WO 00/28972, WO 01/64330, DE 100 01 172 oder WO 00/03797
offenbart.

Die beschriebenen Strukturen zeichnen sich durch einfache
Herstellbarkeit, Lagerstabilität und physiologische
Anwendbarkeit aus, woraus ihr Einsatz bei biochemischen und
pharmazeutischen Anwendungen resultiert. Für eine Reihe von
Anwendungen, insbesondere im Bereich des Advanced Drug
Delivery, gilt das Konzept, das die aufgebrachten
Hüllschichten das Templat schützen oder dessen Oberfläche
verändern, etwa um eine verlängerte biologische Halbwertszeit
zu erreichen. Wirkstoffe können sich dabei im Innern der
Struktur befinden oder Bestandteile der Hüllschichten sein.

Die Stabilität der Hüllschichten ist wegen der Vielzahl der
vorhandenen Bindungen extrem hoch. So offenbart die
DE 198 12 083 einen Erhalt der Hüllschichten auch nach

Calcinierung des Templats bei 500°C oder nach Auflösung des Templats durch starke Säuren, in der WO 00/03797 ist die Stabilität der Strukturen unter verschiedenen pH-Bedingungen und Ionenstärken gezeigt.

5

So wünschenswert die hohe Stabilität der Hüllstrukturen für eine Lagerung und für den Transport der Wirkstoffe ist, so nachteilig ist diese Stabilität, wenn die Wirkstoffe am Wirkort schnell und effektiv freigesetzt werden sollen.

- 10 Derzeit sind keine stabilen Nanokapseln - oder Verfahren zu ihrer Herstellung - bekannt, die sich trotz ihrer Stabilität einfach und schnell auflösen. Dies ist nachteilig, da die für verschiedene klinische oder forschungsrelevante Anwendungen zahlreiche stabile Nanokapseln benötigt werden, die sich unter
- 15 definierten Bedingungen gut und schnell auflösen.

Aufgabe der Erfindung war es daher, leicht auflösbare stabile Nanokapseln bereitzustellen.

- 20 Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung von auflösbaren Nano- oder Mikrokapseln, umfassend ein kolloidales Templat in wässriger Lösung und komplementär geladene Polymere auf dem Templat, wobei mindestens eines der Polymere ein Polyampholyt ist, welcher
- 25 durch eine pH-Wert Änderungent- oder umladbar ist.

- Es wurde überraschend gefunden, dass die erfindungsgemäßen Nanokapseln, stabil sind und sich durch geringe Änderungen des pH-Milieus auflösen lassen. Sie sind daher besonders gut
- 30 geeignet, Wirkstoffe zu transportieren und selektiv wieder freizusetzen. Es wurde also gefunden, dass trotz des sehr stabilen Aufbaus der Kapseln immer noch eine Umladung der Komponenten stattfinden kann und die Kapseln danach zerfallen.

- 35 Unter Polyelektrolyten versteht man im Sinne der Erfindung wasserlösliche Verbindungen, die unter den Reaktionsbedingungen, insbesondere bei dem benutzten pH-Wert eine Vielzahl ionisch geladener Gruppen besitzen. Je nach Art der

- dissoziierbaren Gruppe kann man diese Polyelektrolyte sicher als Polysäuren oder Polybasen klassifizieren. Polysäuren sind etwa Polyvinylschwefelsäure, Polystyrensulfonsäure, Polyacrylsäure, Alginsäure, Pektin, Heparin, Dextransulfat, Nukleinsäuren, Polyglutaminsäure, Polymaleinsäure und andere mehr, etwa Copolymere aus ungeladenen und säuretragenden Monomeren. Polybasen sind beispielsweise Chitosan, Polyethylenimin, Polyallylamin, Polylysin, Polyarginin, Polyquaternium und andere mehr. Weitere Polyelektrolyte sind dem Fachmann z.B. aus der WO 00/28972 oder WO 00/03797 bekannt, die in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen sind. Diese Schriften beschreiben auch einige geeignete Methoden zur Abscheidung der Polyelektrolyte.
- Die Nanokapseln können beispielsweise so hergestellt werden, dass ein oder mehrere Polyampholyte Bestandteil der Hüllschicht sind. Dazu werden die Polyampholyte in einem ihrer zwei definierten Ladungszustände, als Polyanion oder Polykation, verwendet. Die Auflösung der Nanokapseln kann dann beispielsweise durch Entladung oder den Übergang zum jeweils anderen Ladungszustand des Ampholyts erreicht werden.

Die Voraussage des bei einem bestimmten pH-Wert zu erwartenden Ladungszustandes des Gesamtmoleküls z und die Lage des isoelektrischen Punktes kann mit folgender Gleichung [1] berechnet werden:

$$z = \sum n_i * ((q_i - 1) + (10^{(pK_i - pH)} / (1 + 10^{(pK_i - pH)}))) \quad [1]$$

Darin ist

- Z die absolute Anzahl der Ladungen an einem Polymermolekül
 n_i die Anzahl der funktionellen Gruppen mit einem dazugehörigen pK_i und
 q_i die absolute Ladung der einzelnen ionischen Gruppe unterhalb ihres pK (Bsp. Carboxyl = 0, einfache Stickstoffbase = 1, Phosphatgruppe der zweiten Dissoziationsstufe = -1 etc.)

Für Proteine ist dieser Wert in vielen Fällen tabellarisch erfasst oder aus Datenbanken, etwa der SWISS-Prot, zu ermitteln. Die Polyampholyte können je nach ihrem Ladungszustand wie die entsprechenden Polyelektrolyte
5 verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Nanokapseln werden z.B. hergestellt, indem
i) ein kolloidales Templat in wäßriger Lösung mit einem bestimmten pH-Wert vorgelegt und
10 ii) komplementär geladene Polymere auf dem Templat abgeschieden werden, wobei mindestens eines der Polymere ein Polyampholyt ist.

Die Nanokapseln können nach ihrer Herstellung aufgelöst
15 werden, indem sich eine pH-Wert-Änderung so vollzieht, dass eine Entladung oder Umladung des Polyampholyten erfolgt. Die Herstellung und Lagerung der Nanokapseln erfolgt also bei einem bestimmten pH-Wert und die Auflösung bei einem veränderten pH-Wert, wobei der isoelektrische Punkt des
20 Polyampholyten zwischen den beiden pH-Werten liegt.

Bei der Herstellung der Kapseln werden jeweils komplementär geladene Polymerschichten, wobei mindestens ein Polymer ein Polyampholyt ist, bei einem bestimmten pH-Wert auf das Templat
25 aufgebracht, so dass bevorzugt jeweils eine beliebige Anzahl - aber mindestens zwei - direkt aufeinanderfolgende unterschiedlich geladene Schichten auf dem Templat vorliegen. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass eine Struktur eines Coazervates vorliegt. Durch eine Änderung des pH-Wertes
30 kommt es zu einer Um- oder Entladung des Polyampholyten, so dass zum Teil nicht mehr komplementär geladene Polymerschichten vorliegen. Beispielsweise ist es durch die pH-Wert Änderung möglich, dass gleich geladene Schichten vorliegen. Diese gleich geladenen Schichten stoßen sich
35 einander ab, was zu einem Auseinanderbrechen der Polymerschichten und folgend zu einer Auflösung der Nano- oder Mikrokapseln führt.

Dieser Prozess ist im Beispiel 1 näher ausgeführt. Hier werden liposomale Nanokapseln unter Verwendung von Serumalbumin hergestellt. Bei dem benutzten pH-Wert von 4 liegt das Albumin als Polykation vor und kann mit dem anionischen Heparin
5 wechselwirken. Es lassen sich stabile Kapseln mit mehreren Schichten der Polymere aufbauen. Wird der pH-Wert des Mediums jedoch auf 7 erhöht, so zerfallen diese Kapseln sehr schnell. Dieser Mechanismus erlaubt eine Reihe von Anwendungen.

10 Geeignete kolloidale Template nach i) sind anorganische oder organische Mikro- und Nanopartikel, die kolloidal gelöst in wäßrigen Medien vorliegen. Diese Gruppe umfasst insbesondere Mikropartikel einer Größe von weniger als 10 μm und mehr als 20 nm, bevorzugt weniger 5 μm und mehr als 50 nm und besonders
15 bevorzugt weniger als 1 μm und mehr als 70 nm. Besonders geeignete Template sind organische Partikel wie etwa Polymer-Latizes, aber auch Zellen oder Zellbestandteile.

In einer vorteilhaften Ausführungsform sind die Template
20 Kristalle, insbesondere schwer wasserlösliche Kristalle oder Kristalle, deren Oberfläche mit Ladungsträgern modifiziert sein kann. Geeignete Template sind weiterhin Liposomen oder Öl/Wasser-Emulsionen oder Wasser/Öl/Wasser-Doppelemulsionen. Die Herstellung der Nano- oder Mikrokapseln auf diesen
25 Templaten ist dem Fachmann bekannt, die verschiedenen Herstellungsmethoden sind insbesondere für spezifische Verwendung vorteilhaft. Liposomen, o/w-Emulsionen und w/o/w-Emulsionen, aber auch Kristalle als bevorzugte Template zeichnen sich dadurch aus, dass sie sehr leicht, etwa durch
30 Einwirkung von Detergenzien oder Lösungsvermittlern aus den Strukturen zu entfernen sind. Mit Hilfe dieser Template können daher mit Vorteil Hohlkörper im Mikro- oder Nanometermassstab gefertigt werden. Weiterhin kann vorteilhafter weise die Ladung dieser Template sehr leicht durch Variation der
35 Zusammensetzung variiert werden.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte sind ganz besonders vorteilhaft solche Liposomen und Emulsionen, die

einen hohen Anteil geladener Membranbestandteile besitzen. Geeignete Komponenten sind unter anderem geladene amphipatische Verbindungen, die sich in die Grenzschicht einlagern können. Zu den vorteilhaften Verbindungen gehören

5 daher natürliche oder synthetische Phospholipide und deren Derivate, insbesondere Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol oder Phosphatidsäure, aber auch Sphingolipide, Ceramide, Tetraetherlipide oder andere Etherlipide sowie geladene Derivate des Cholesterols wie Cholesterolsulfat,

10 Cholesterolhemisuccinat, Dimethylaminoethylcarbamoyl-Cholesterol und andere dieser Verbindungen. Zu den Verbindungen gehören mit Vorteil weiterhin Alkyl- oder Alkenyl-carbonsäuren, -sulfonsäuren (Laurylsulfat), -amine, -ammoniumsalze (Cetylammmoniumbromid), Dialkylamine oder -

15 ammoniumverbindungen wie DOTAP oder DOTIM, Phosphorsäureester mit langkettigen Alkoholen (Cetylphosphat) und weitere membranbildende oder membranständige geladene Verbindungen. Ungeladene Membranbestandteile wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, a-Tocopherol, Cholesterol und andere

20 mehr können zusätzlich als membranbildende Komponenten verwendet werden, insbesondere wenn liposomale Template vorliegen.

Vorteilhafte Anteile bei liposomalen Templaten liegen

25 insbesondere zwischen 10 und 50% für sterolartige Ladungsträger und oberhalb von 10% für Ladungsträger auf der Basis von Phospholipiden. Unter den o/w-Emulsionen und den w/o/w-Emulsionen sind solche Formen besonders bevorzugt, die einen hohen Anteil geladener Emulgatoren aufweisen. So liegt

30 vorteilhaft der Anteil geladener Emulgatoren oberhalb 10% der Gesamtemulgatormenge, besonders vorteilhaft oberhalb 30% dieser Menge.

Nach der Bereitstellung des Templates in wässriger Suspension

35 werden Polyampholyte und/oder Polyelektrolyte auf den Templaten abgeschieden. Diese Abscheidung erfolgt bevorzugt schichtweise geordnet, so dass komplementär geladene Schichten unmittelbar aufeinander folgen. Eine beliebige Anzahl,

mindestens aber zwei dieser Schichten können auf der Oberfläche der Template abgeschieden werden. Ein erfindungswesentliches Merkmal ist nach ii) der Einbau von einem oder mehreren Polyampholyten in solche Nanokapseln.

5 Polyampholyte sind solche wasserlöslichen Polymere, die sowohl saure als auch basische Gruppen enthalten. Je nach pH-Wert des Mediums und Art und Anzahl der ionogenen Gruppen können diese Moleküle als Polyanion, als nach aussen ungeladene Spezies oder als Polykation vorliegen. Polyampholyte haben im

10 Unterschied zu Polysäuren oder Polybasen einen isoelektrischen Punkt, bei dem ihre Nettoladung Null ist.

Wasserlösliche Polyampholyte und Verfahren zu ihrer Herstellung sind in den folgenden Offenbarungen beschrieben;

15 US 3,929,743: synthetische lineare (Co-)Polymere umfassend Carboxylgruppen, die nach der Polymerisation teilweise iminiert werden; US 4,522,708 und WO 034581A1: synthetische lineare Copolymere aus einer Acrylsäure, Acrylamid und Dimethyl- oder Diethyldiallyl-ammoniumhalogenid; US 4,959,163:

20 Synthetische lineare Copolymere aus einfach geladenen oder ungeladenen monoolefinischen Monomeren und einem zwitterionischen monoolefinischen Monomer; US 5,132,285: graft-Copolymere aus Stärke und zwitterionischen Monomeren oder kationischen/anionischen Monomerpaaren; JP 8157501: N-

25 Carboxyacetylchitosan durch Umsetzung von Chitosan und Bernsteinsäureanhydrid oder Pthalsäureanhydrid; US 3,673,171: modifizierte amphotere Stärke mit basischen und sauren Gruppen und WO 00/39176, die die Herstellung von hydrophilen Polyampholyten, umfassend eine große Zahl möglicher

30 anionischer oder kationischer Monomere, beschreibt, wobei die kationischen Monomere bevorzugt im Überschuss eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen

35 die Kapseln als Polyampholyte mindestens ein Proteine.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die Proteine Albumine, Hämoglobine, Myoglobine, Antikörper,

Proteasen, Proteaseinhibitoren, Lipasen, Esterasen, Amylasen, Dehydrogenasen Kollagene, Fibrinogene, Protein A, Protein G, Lektine und/oder Histone. Weitere geeignete Verbindungen sind Peptide, Heteropolymere aus Aminosäuren, umfassend eine
5 Vielzahl von Histidinen, Asparaginsäuren oder Glutaminsäuren, oder acylierte Protamine.

Polyampholyte lassen sich aber auch durch nachträgliche Modifikation bestehender Polymere herstellen, etwa indem ein
10 Dextransulfat oder eine Alginsäure partiell aminiert werden oder indem ein Chitosan oder Polyallylamin partiell carboxyliert, sulfatiert oder phosphoryliert wird.

Polyampholyte können unabhängig von ihrer chemischen Natur
15 nach ihrer Ladungscharakteristik bei verschiedenen pH-Werten eingeteilt werden. Diese Ladungsfunktion wird durch die Gleichung [1] beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weisen die
20 Kapseln mindestens ein Polyampholyt einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 auf. Bevorzugte Polyampholyte sind solche mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9. Sie umfassen in jedem Fall mindestens eine Klasse funktioneller Gruppen, deren pK zwischen 4 und 9 liegt. Bevorzugte
25 anionische Gruppen sind Carboxylgruppen. Ihrer chemischen Natur nach sind die bevorzugten Kationen Stickstoffbasen wie beispielsweise Piperazine, Imidazole und Morpholine oder Thiomorpholine, Purine oder Pyrimidine sowie Amine an aromatischen Systemen. Bevorzugt sind solche Molekülfragmente,
30 wie sie in biologischen Systemen vorkommen, also beispielsweise 4-Imidazole (Histamin), 2-, 6- oder 9- Purine (Adenine, Guanine, Adenosine oder Guanosine), 1-, 2- oder 4- Pyrimidine (Uracile, Thymine, Cytosine, Uridine, Thymidine, Cytidine) oder auch Pyridin-3-carbonsäuren (Nicotinsäureester
35 oder -amide).

Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten entstehen auch durch einfache oder mehrfache Substitution des Stickstoffatoms

mit Niederalkanhydroxylen, etwa Hydroxymethyl- oder Hydroxyethylgruppen. Geeignete organische Basen aus dieser Gruppe sind beispielsweise Aminopropandiole, Triethanolamine, Tris- (hydroxymethyl)methylamine, Bis- (hydroxymethyl)methylamine, Tris- (hydroxyethyl)methylamine, Bis- (hydroxyethyl)methylamine oder die entsprechend substituierten Ethylamine.

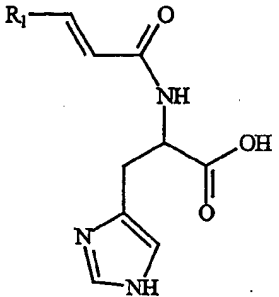
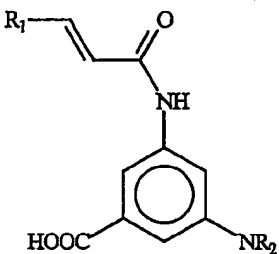
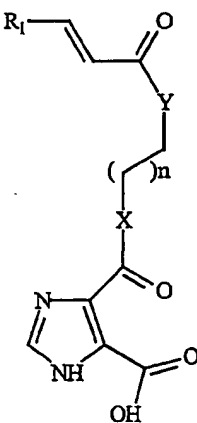
Besonders bevorzugte Polyampholyte enthalten sowohl anionische als auch kationische Ladungsträger aus den oben genannten Gruppen. Weiter bevorzugt sind Polyampholyte, bei denen die pK-Werte der Ladungsträger nicht mehr als 3 Einheiten auseinander liegen. Ganz besonders bevorzugt sind Polyampholyte, bei denen die pK-Werte der Ladungsträger nicht mehr als 2 Einheiten auseinander liegen.

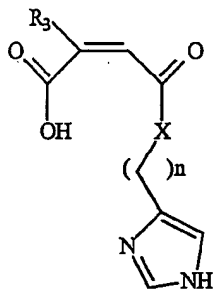
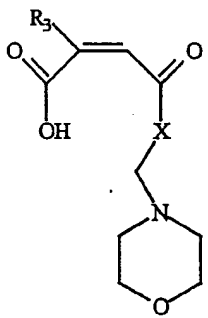
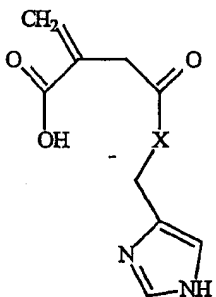
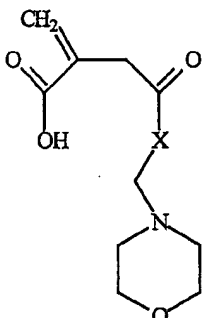
Zusätzlich können weitere Funktionen auf solchen Polymeren vorhanden sein, so etwa ionische Gruppen mit einem pK-Wert außerhalb des genannten Bereiches oder nichtionische polare Gruppen wie Hydroxylfunktionen oder Amidgruppen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit. Die oben beschriebenen funktionellen Gruppen sind jedoch notwendig für die Funktion des Ampholyten im bevorzugten pH-Bereich.

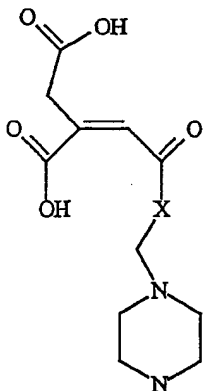
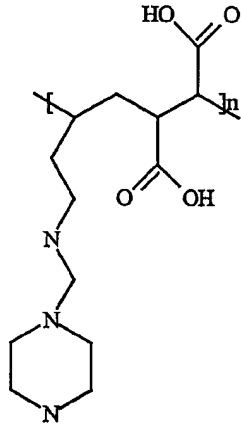
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die Polyampholyte ethylenisch ungesättigten Struktureinheiten. Polyampholyte können als statistische lineare Copolymere vorliegen, bei denen anionische und kationische Gruppen einander unregelmässig abwechseln. Mit Vorteil können für die Ausführung der Erfindung weitere spezialisierte Polymere verwendet werden, die eine Vielzahl identischer zwitterionischer Struktureinheiten umfassen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen die Polyampholyte zwitterionische Struktureinheiten aus acrylsubstituierten Histidinen, Diaminobenzoesäuren, Imidazoldicarbonsäuren; Maleinsäuremonoimidazolen, -morpholinen, -thiomorpholinen; der Itaconsäuremonoimidazole, -

morpholine, -thiomorpholine; der Aconitsäuremonoimidazole, -morpholine, -thiomorpholine und/oder -piperazine. Die folgende Tabelle gibt besonders bevorzugte Ausführungen für Struktureinheiten aus ethylenisch ungesättigten Monomeren wieder:

| | |
|---|--|
|  | <p>Acrylamido-Histidine. Der Rest R1 kann Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl oder Hydroxyisopropyl sein. Anstelle der Acrylsäure kann sinngemäss auch Crotonsäure stehen.</p> |
|  | <p>N-(Acrylamido)-Diaminobenzoessäuren. Für den Rest R1 und die ethylenisch ungesättigte Gruppe gelten die oben gemachten Ausführungen. R2 ist unabhängig davon Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl oder Hydroxyisopropyl oder eine Kombination dieser Reste.</p> |
|  | <p>Monomere umfassend Acrylsäure und Imidazol-(4,5)-dicarbonsäure. Der Rest R1 kann Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl oder Hydroxyisopropyl sein. Anstelle der Acrylsäure kann sinngemäss auch Crotonsäure stehen. Die beiden funktionellen Elemente sind über einen Spacer miteinander verbunden. X und Y sind bevorzugt unabhängig voneinander Stickstoff oder Sauerstoff, die zwischen den beiden Heteroatomen liegende Alkylkette hat 0 bis 8 C-Atome und ist linear oder verzweigt oder</p> |

| | |
|--|--|
| | zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten. Der Spacer kann auch ein Polyethylenglykol sein. |
|   | <p>Maleinsäuremonoimidazole oder -morpholine oder -thiomorpholine. Der Rest R₃ kann Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl oder Hydroxyisopropyl sein. Der Rest R₃ kann auch eine weitere Carbonsäurefunktion umfassen, insbesondere kann anstelle der Maleinsäure Aconitsäure stehen.</p> <p>X ist Sauerstoff oder Stickstoff, die zwischen X und dem kationischen Rest liegende Alkylkette hat 0 bis 8 C-Atome und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten. ()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein.</p> |
|   | <p>Itaconsäuremonoimidazole oder -morpholine oder -thiomorpholine.</p> <p>X ist Sauerstoff oder Stickstoff, die zwischen X und dem kationischen Rest liegende Alkylkette hat 0 bis 8 C-Atome und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten. ()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein.</p> |

| | |
|--|---|
|  | <p>Aconitsäuremonopiperazine.</p> <p>X ist Sauerstoff oder Stickstoff, die zwischen X und dem Piperazin liegende Alkylkette hat 0 bis 8 C-Atome und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten. ()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein.</p> <p>Das Piperazin kann an der N'-Position weiter substituiert sein, insbesondere mit einem Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl oder Hydroxy-isopropylrest.</p> |
|  | <p>Additionsprodukt aus Aminoethylpiperazin und Poly-(alt-Maleinsäure/Butadien). Anstelle des Piperazins können auch Morpholin, Thiomorpholin oder Imidazol stehen.</p> |

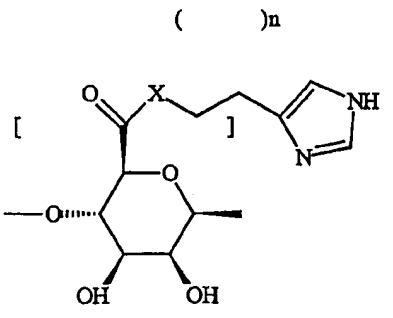
- Polymere, umfassend die genannten Struktureinheiten können sowohl durch Polymerisation der hier gezeigten Monomere entstehen, aber auch als graft-Polymere aus Vorläufern.
- 5 Geeignete Precursoren sind etwa Poly-(alt-Maleinsäureanhydrid/Ethylen) oder auch Poly-(acrylsäureanhydrid) oder Poly-(acryloylchlorid), aus denen leicht die entsprechenden Ester oder Amide zugänglich sind.
- 10 Die Polyampholyte können weitere, insbesondere nichtionische Monomere enthalten. Besonders bevorzugte Ausführungsformen sind:
- statistische oder alternierende Copolymerisate der Acrylate oder Crotonate mit Acrylamid.

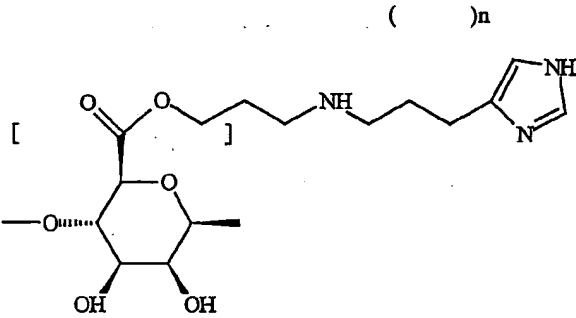
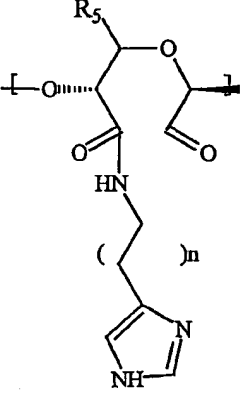
- alternierende Copolymerisate der Maleate, Itaconate oder Aconitate mit Ethylen oder Butadien.

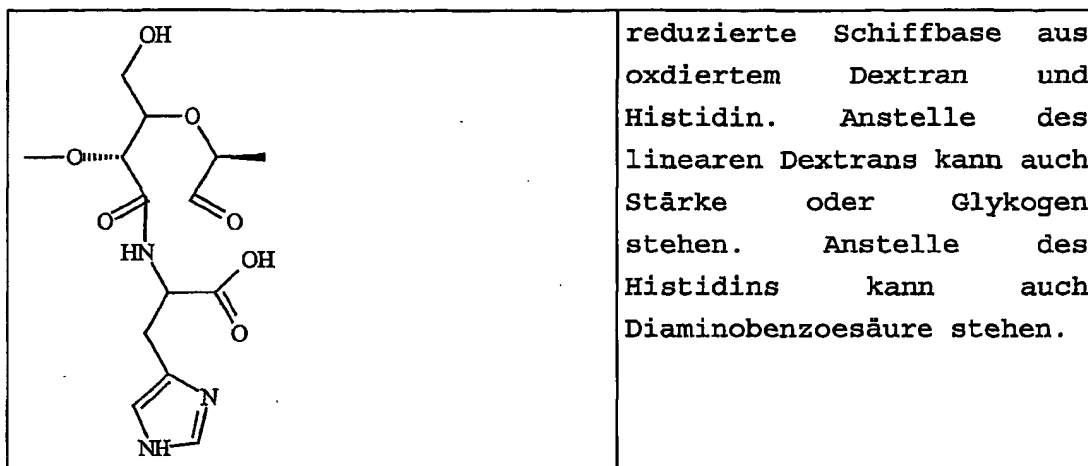
Die Polymere aus ethylenisch ungesättigten Monomeren sind
 5 zumindest in ihrem Rückgrat nicht biologisch abbaubar. Sollen
 diese Polymere bei pharmazeutischen Anwendungen in den Körper
 gebracht werden, so ist deren Akkumulation nur durch
 Ausscheidung zu verhindern. Solche Polymere haben bevorzugt
 eine Molmasse von weniger als 100 kDa, besonders bevorzugt
 10 weniger als 30 kDa. Für ihre Funktionalität beim Aufbau von
 Polyelektrolytmultischichten sind Molmassen von mehr als 10
 kDa vorteilhaft.

Biologisch abbaubare Polymere sind aus den Polyzuckern
 15 zugänglich. Vorteilhaft ist die Modifizierung von mindestens
 20% bis zu 80% der Carboxylgruppen eines Alginats durch
 kationische Komponenten mit einem pK im Bereich zwischen 4 und
 9. Geeignete Ladungsträger sind oben genannt.

20 Die folgende Tabelle gibt vorteilhafte Ausführungen für
 bevorzugte Strukturelemente in Polyzuckern.

| | |
|---|--|
|  | <p>Amide oder Ester der Alginsäure. X bedeutet Stickstoff oder Sauerstoff, ()_n ist eine Alkylkette mit 0 bis 8 C-Atomen und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten. ()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein. Als kationische Gruppe kann insbesondere auch Morpholin, Thiomorpholin, Diaminbenzoesäure oder Piperazin stehen.</p> |
|---|--|

| | |
|--|--|
|  | <p>Aminoester der Alginsäure.</p> <p>()_n ist eine Alkylkette mit 0 bis 8 C-Atomen und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten.</p> <p>()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein. Als kationische Gruppe kann insbesondere auch Morpholin, Thiomorpholin, Diaminbenzoesäure oder Piperazin stehen.</p> |
|  | <p>reduzierte Schiffbasen aus Aminoimidazol und oxidierten Dextranen. R₅ kann Wasserstoff, Hydroxymethyl oder eine Carbonsäure sein.</p> <p>()_n ist eine Alkylkette mit 0 bis 8 C-Atomen und ist linear oder verzweigt oder zyklisch geschlossen und kann weitere Hydroxylfunktionen enthalten.</p> <p>()_n kann auch ein Polyethylenglykol sein. Als kationische Gruppe kann insbesondere auch Morpholin, Thiomorpholin, Diaminbenzoesäure oder Piperazin stehen.</p> |



Die Erfindung lässt sich mit Vorteil auch durch den Einsatz von carboxylierten Polyethyleniminien realisieren. Diese Derivate sind durch Umsetzung der Polyethylenimine mit

5 Halogencarbonsäuren, beispielsweise Chloressigsäure, ethylenisch ungesättigten Carbonsäuren, beispielsweise Acrylsäure, Methacrylsäure, Crotonsäure, Maleinsäure, Itconsäure, Aconitsäure, oder mit Säurechloriden oder -anhydriden zugänglich beispielsweise Maleinsäureanhydrid,

10 Itaconsäureanhydrid, Aconitsäureanhydrid, Ethylendiaminoessigsäuredianhydrid.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die Polyampholyte modifizierte Alginsäuren, Dextrane, Stärken,

15 Glykogenen, Polyglycerolen, Guar Gummis oder Pektine sind, wobei diese mindestens einen Substituenten der Imidazole, Morpholine, Thiomorpholine, Piperazine, Histidine und/oder Diaminobenzoessäuren.

20 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Nano- oder Mikrokapseln zur Verpackung und Freisetzung von Wirkstoffen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Kapseln zur oralen Wirkstoffapplikation verwendet, wobei eine Polymerhülle

25 einen solchen pH-Wert aufweist, dass die Kapseln bei einem pH-Wert ≥ 7 zerfallen. Dem Fachmann ist bekannt, welchen isoelektrischen Punkt der Polyampholyt hierzu aufweisen muss

und wie dieser eingestellt werden kann. In einer vorteilhaften Verwendung solcher Nanokapseln werden diese für ein orales Transfersystem verwendet. Dabei erfolgt die Herstellung und Lagerung des wirkstofftragenden Systems bei dem oben
5 beschriebenen leicht sauren pH-Wert. Lösungen mit diesem pH sind problemlos oral aufnehmbar und passieren den sauren Mageninhalt in einer stabilen Form. Mit dem Erreichen des Zwölffingerdarms erfolgt eine Neutralisierung der Lösung, damit zerfallen die Hüllschichten und geben das Templat frei.

10

Besonders bevorzugt kann dieses System auf Basis von liposomalen Templaten verwendet werden. Die Liposomen können vom Fachmann so ausgeführt werden, dass sie dicht gegenüber pH-Schwankungen des Aussenmediums sind und dadurch den
15 Wirkstoff vor dem Angriff der Magensäure schützen. Solche Liposomen sind beispielsweise für das remote-loading von Wirkstoffen entwickelt worden und im Stand der Technik bekannt. Nach dem Abwerfen der äußeren Hüllschicht stellt die Lipidmembran ihrerseits eine letzte Barriere für die
20 Freisetzung eines eingeschlossenen Wirkstoffs dar. Eine letztliche Freisetzung aus den Liposomen ist aber durch die Aktivität der im Darm vorhandenen Phospholipasen und durch den Gallensaft gegeben.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Kapseln zum Transport von Wirkstoffen in Zellen und/oder in Tumorgewebe verwendet, wobei die Kapseln bei einem pH-Wert ≤ 7 zerfallen.

30 Eine weitere Möglichkeit des Transports von Wirkstoffen besteht in der Nutzung relativ fusogener Liposomen, die ihren Wirkstoff direkt in Zellen der Mucosa abgeben. Solche Liposomen sind dem Fachmann bekannt und enthalten größere Anteile von Phosphatidylethanolamin und/oder kationische
35 Lipide. Diese Liposomen können mit Hüllen, umfassend Polyampholyte, bis in den Darm gebracht werden und geben dann den Wirkstoff direkt in die Zellen der Darmwand ab. In diesem

Fall wird jeglicher Kontakt des Wirkstoffes mit dem Verdauungsapparat vermieden.

In einer weiteren vorteilhaften Verwendung der Erfindung werden die schaltbaren Nanokapseln zur rektalen Applikation von Wirkstoffen eingesetzt. Hier können die eigentlichen Wirkstoffträger wie Liposomen oder Emulsionen in rektal gut applizierbaren Darreichungsformen wie beispielsweise Suppositorien bei der Herstellung und Lagerung stabilisiert werden.

Eine weitere vorteilhafte Anwendung der erfinderischen Lehre lässt sich mit der gegensätzlich geladenen Kombination aus anionischem Protein - Albumin oder Kollagen bei pH >6, Hämoglobin bei pH>7.5 - und einem Polykation wie beispielsweise Chitosan, Polylysin oder Polyallylamin herstellen. Solche Nanokapseln sind sensitiv gegenüber sauren Milieus und können bei der Freisetzung von Wirkstoffen während der Endozytose, im Innern von Tumoren oder im Hautschweiss verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Kapseln zur Freisetzung von Wirkstoffen auf der Haut und/oder für kosmetische Zwecke, wobei die Kapseln bei einem pH-Wert <=7 zerfallen.

Eine weitere vorteilhafte Verwendung betrifft die Stabilisierung von Liposomen oder Emulsionen oder Doppelemulsionen in kosmetischen und pharmazeutischen Cremes oder Salben. Insbesondere Liposomen oder Doppelemulsionen sind in den gängigen Formulierungen instabil und geben den eingeschlossenen Wirkstoff schon während der Lagerung des Produktes frei. Eine Nanoverkapselung dieser Strukturen kann unter Verwendung von Polyampholyten so ausgeführt werden, dass die eigentlichen Wirkstoffträger während der Lagerung stabilisiert werden, aber auf der Haut wieder entkapselt vorliegen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Kapseln zur Verkapselung und Freisetzung von Waschmittelenzymen verwendet, wobei die Kapseln bei einem pH-Wert ≤ 9 zerfallen. Konzentrierte Flüssigwaschmittel haben
5 einen pH-Wert zwischen 9 und 11, der beim Verdünnen in die Waschlösung auf Werte um 8 sinkt. Unter diesen Bedingungen verringert sich die Ladung der verwendeten Proteasen erheblich und die Kapseln lösen sich mit der Verdünnung vollständig auf.

10 Besonders bevorzugt ist es, Waschmittelenzyme zu verwenden, die Proteasen und/oder Subtilisin umfassen. In dieser vorteilhaften Anwendungsform werden Nanokapseln aus Subtilisin und einem Polykation wie etwa Polyallylamin, Polyquaternium, Polyvinylpyridin, kationischer Stärke oder ähnlichen
15 Verbindungen hergestellt. Die Protease als Wirkstoff ist in diesem Fall Bestandteil der Hüllschicht, als Templat werden entfernbare und ökologisch unbedenkliche Strukturen wie Liposomen oder Emulsionen eingesetzt. Durch die sehr geringe Größe der Strukturen tritt optisch keine Trübung des Produkts
20 auf. Ein weiterer Vorteil ist durch den gleichzeitig möglichen Einsatz von anderen Waschmittelenzymen, wie etwa Zellulasen oder Lipasen gegeben. Solche Kombinationen sind mit konventionellen Formulierungen nicht herstellbar, da freie Protease zum schnellen Abbau der anderen Enzyme führt.

25 Die erfindungsgemäßen Nanokapseln weisen gegenüber den bekannten Nanokapseln mehrere Vorteile auf. Bekannte Nanokapseln bestehen bisher unabhängig von ihrem Templat aus wasserlöslichen Polymeren, die durch ionische Wechselwirkungen
30 zusammengehalten werden. Wesentlich für ihre Struktur ist das Vorhandensein einer Vielzahl von wechselwirkenden Gruppen an den verwendeten Polymeren. Durch die beim Aufbau stattfindende Vernetzung wird eine hohe Stabilität der Gesamtstruktur erzeugt, was zu einer extrem hohen Stabilität der Nanokapseln
35 führt und die Freisetzung der eingeschlossenen Substanzen verhindert. Ein besonderer Vorteil der Verwendung von Polyampholyten für den Aufbau von Nanokapseln besteht darin, dass diese Kapseln unter einfachen Bedingungen wieder

aufgelöst werden können. Dadurch sind diese Nanokapseln, insbesondere deren Hüllstruktur, als ein vielseitig nutzbares Verpackungs- und Freisetzungssystem nutzbar.

- 5 Weitere vorteilhafte Ausgestaltungsformen ergeben sich aus der Beschreibung.

Im folgenden soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen veranschaulicht werden, ohne die
10 Erfindung darauf einzuschränken.

Beispiel 1

Liposomale Nanokapseln aus Albumin und Heparin

15

Herstellung der Liposomen

20 mol-% Dipalmitoylphosphatidylcholin und 80 mol-%
Dipalmitoyl-phosphatidylglycerol werden in Isopropanol gelöst
und unter Vakuum bis zur Trockene eingedampft. Der Lipidfilm
20 wird anschließend in soviel Puffer (10mM Hepes, 150mM NaCl
pH7,5) rehydratisiert, dass eine Lipidkonzentration von 25mM
erreicht wird. Die Suspension wird mindestens einmal
eingefroren, bei 50°C wieder aufgetaut und dann mehrmals durch
isopore Polykarbonatmembranen mit einer Porengröße von 200nm
25 gedrückt.

Beschichtung mit Albumin und Heparin und Analyse der Strukturen

Die Polymere werden in den Konzentrationen von 1mg/ml und
30 5mg/ml in Puffer (10mM Natriumacetat, pH4) gelöst. Die
Liposomen werden in Puffer (10mM Natriumacetat, pH4) auf eine
Lipidkonzentration von 0,2mM verdünnt. Zu 50ml dieser
verdünnten Liposomen werden nacheinander geeignete Mengen der
beiden Polymere (siehe Tabelle) zugemischt. Die jeweils
35 eingesetzte Menge Polymer bindet hinreichend vollständig an
die Partikeloberfläche, so dass keine Reinigungsschritte
zwischengeschaltet werden müssen.

| Schicht (S) | mg Polymer/mg Lipid |
|-------------|---------------------|
| S1 BSA | 1,00 |
| S2 Heparin | 0,33 |
| S3 BSA | 4,75 |
| S4 Heparin | 1,59 |
| S5 BSA | 12,66 |
| S6 Heparin | 4,22 |

100 μ l der Suspension werden anschließend durch Zugabe von 100 μ l HEPES-Puffer (200mM, pH7.5) neutralisiert, die Probe wird dann durch ein Filter der Weite 0,1 μ m filtriert. Die enzymatische Aktivität kann im Filtrat nachgewiesen werden. Das ist nicht der Fall, wenn die zu filtrierende Suspension einen pH-Wert von weniger als 5 aufweist.

10 Beispiel 2

Liposomale Nanokapseln aus Subtilisin und Polyallylamin

Liposomen mit einer Zusammensetzung aus 40 Mol-% Cholesterylhemisuccinat und 60 Mol-% Soja-Lecithin werden wie oben durch Extrusion hergestellt. Subtilisin wird mit einer Konzentration von 5mg/ml und Polyallylamin mit einer Konzentration von 1mg/ml in Puffer (100mM Natriumcarbonat, pH 10.0) gelöst. Die Liposomen werden in Wasser auf eine Konzentration von 0.2mM verdünnt. Die unten aufgeführten Mengen Polymer werden nacheinander unter schnellem Rühren zu den Liposomen gegeben:

| | |
|------------------|-----------------------|
| S1 Polyallylamin | 80 μ g/mg Lipid |
| S2 Subtilisin | 220 μ g/mg Lipid |
| S3 Polyallylamin | 150 μ g/mg Lipid |
| S4 Subtilisin | 840 μ g/mg Lipid |
| S5 Polyallylamin | 230 μ g/mg Lipid. |

Die schichtweise Abscheidung des Polymers kann durch Messungen des Zetapotentials verfolgt werden.

100 μ l der Suspension werden anschließend durch Zugabe von 100 μ l Phosphatpuffer (100mM, pH6.5) neutralisiert, die Probe

wird dann durch ein Filter der Weite 0,1µm filtriert. Die enzymatische Aktivität kann im Filtrat nachgewiesen werden. Das ist nicht der Fall, wenn die zu filtrierende Suspension einen pH-Wert von mehr als 9 aufweist.

5

Beispiel 3

Synthese eines Polyampholyten 1

10

5g Poly-(alt-ethylene/maleic anhydride), 100kDa, werden in 100ml trockenem Dioxan gelöst. Dazu wird langsam 50ml einer Lösung von 60mMol 2-Aminoethylmorpholin in Dioxan gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden bei 50°C gerührt und am 15 Rotationsverdampfer auf 50ml eingengt. Dem Produkt werden 500ml Wasser zugesetzt und der pH-Wert wird auf 7 eingestellt. Dioxan und überschüssiges Aminoethylmorpholin werden durch Ultrafiltration entfernt, das Polymer wird auf 100ml eingengt und anschließend lyophilisiert.

20

Beispiel 4

Synthese eines Polyampholyten 2

25

2g Dextran (70kDa) werden in 100ml Puffer (10mM HEPES, 150mM NaCl pH 8,0) gelöst. Zur Lösung werden unter Rühren nacheinander 50mMol L-Histidin und 20mMol Natriumperiodat gegeben, es wird 5 Stunden bei 60°C gerührt. Dabei wird der 30 pH-Wert in einem Bereich zwischen 7 und 8 gehalten. Nach dem Abkühlen werden 50mMol Natriumborhydrid zugegeben, die Mischung wird dann über Nacht weiter gerührt. Die Reinigung des Polymers erfolgt wie oben durch Ultrafiltration, zur Lagerung wird das Produkt lyophilisiert.

35

Patentansprüche

1. Auflösbare Nano- oder Mikrokapseln, umfassend ein
kolloidales Templat in wässriger Lösung und komplementär
5 geladene Polymere auf dem Templat, wobei mindestens eines
der Polymere ein Polyampholyt ist, welcher durch eine pH-
Wertänderung ent- oder umladbar ist.
- 10 2. Kapseln nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Templat ein Liposom, eine Öl- in Wasser- Emulsion,
eine Wasser/Öl/Wasser-Doppelemulsion, einen anorganischen
und/oder organischen Kristall umfasst.
15
3. Kapseln nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Differenz der pK-Werte von mindestens zwei
20 Ladungsträgern der Polyampholyte nicht mehr als 3
Einheiten umfasst, besonders bevorzugt nicht mehr als 2
Einheiten.
- 25 4. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
mindestens ein Polyampholyt einen isoelektrischen Punkt
zwischen 4 und 9 aufweist.
- 30 5. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Polyampholyte Proteine umfassen.
- 35 6. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, dass

5 die Proteine Albumine, Hämoglobine, Myoglobine, Antikörper, Proteasen, Proteaseinhibitoren, Lipasen, Esterasen, Amylasen, Dehydrogenasen Kollagene, Fibrinogene, Protein A, Protein G, Lektine und/oder Histone umfassen.

7. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass
10 die Polyampholyte ethylenisch ungesättigten Struktureinheiten umfassen.

8. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
15 dadurch gekennzeichnet, dass
die Polyampholyte zwitterionische Struktureinheiten aus acrylsubstituierten Histidinen, Diaminobenzoesäuren, Imidazoldicarbonsäuren; Maleinsäuremonoimidazolen, -morpholinen, -thiomorpholinen; der
20 Itaconsäuremonoimidazole, -morpholine, -thiomorpholine; der Aconitsäuremonoimidazole, -morpholine, -thiomorpholine oder -piperazine umfassen.

25 9. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass
die Polyampholyte modifizierte Alginsäuren, Dextrane, Stärken, Glykogenen, Polyglycerolen, Guar Gummis oder Pektine sind, wobei diese mindestens einen Substituenten
30 der Imidazole, Morpholine, Thiomorpholine, Piperazine, Histidine und/oder Diaminobenzoesäuren umfassen.

10. Verfahren zur Herstellung von Nano- oder Mikrokapseln nach
35 einem der Ansprüche 1 bis 9 in dem ein kolloidales Templat in wäßriger Lösung von Polymeren umhüllt wird, dadurch gekennzeichnet, dass

die Polymere komplementär geladen und mindestens ein Polymer ein Polyampholyt ist.

- 5 11. Verwendung der Nano- oder Mikrokapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Verpackung und Freisetzung von Wirkstoffen.
- 10 12. Verwendung der Kapseln nach Anspruch 11 zur oralen Wirkstoffapplikation,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Kapseln bei einem pH-Wert ≥ 7 zerfallen.
- 15 13. Verwendung der Kapseln nach Anspruch 11 zum Transport von Wirkstoffen in Zellen und/oder in Tumorgewebe,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Kapseln bei einem pH-Wert ≤ 7 zerfallen.
- 20 14. Verwendung der Kapseln nach Anspruch 11 zur Freisetzung von Wirkstoffen auf der Haut und/oder für kosmetische Zwecke,
25 dadurch gekennzeichnet, dass
die Kapseln bei einem pH-Wert ≤ 7 zerfallen.
- 30 15. Verwendung der Kapseln nach Anspruch 11 zur Verkapselung und Freisetzung von Waschmittelenzymen,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Kapseln bei einem pH-Wert ≤ 9 zerfallen.
- 35 16. Verwendung der Kapseln nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Waschmittelenzyme Proteasen und/oder Subtilisin umfassen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/06001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J13/02 A61K8/11 A61K9/50 A61K9/51 C11D3/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J A61K C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | DE 198 10 965 A (AVENTIS RES & TECH GMBH & CO) 16 September 1999 (1999-09-16) the whole document | 1-7,9-11 |
| A | EP 0 681 834 A (VOGT WALTER DR ;POMMERSHEIM RAINER (DE); SCHREZENMEIR JUERGEN (DE)) 15 November 1995 (1995-11-15) the whole document | 1-16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2002

Date of mailing of the international search report

10/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willsher, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/06001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | <p>WEN S ET AL: "Microcapsules through polymer complexation - Part 3: encapsulation and culture of human Burkitt lymphoma cells in vitro" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 16, no. 4, 1995, pages 325-335, XP004033057 ISSN: 0142-9612 the whole document</p> | 1-16 |
| A | <p>MEYENBURG S ET AL: "Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system - Studies on the in vitro release behavior" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 69, no. 1, 3 October 2000 (2000-10-03), pages 159-168, XP004217542 ISSN: 0168-3659 the whole document</p> | 1-16 |
| P,X | <p>WO 02 09864 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;SEIBT HORST (DE); VOIGT ANDREAS (DE); ANT) 7 February 2002 (2002-02-07) page 7, line 30 -page 7, line 31; claims 1,4-8,11,22</p> | 1,2,10, 11,14 |
| P,X | <p>WO 02 31092 A (RYBINSKI WOLFGANG ;HENKEL KGAA (DE); KRUPP UTE (DE); MEIER FRANK ()) 18 April 2002 (2002-04-18) page 10, line 24 -page 10, line 25; claims 1,3,6,8,11,15,24-27</p> | 1,2,10, 11,14,15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/06001

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 19810965 | A | 16-09-1999 | DE 19810965 A1 | 16-09-1999 |
| | | | AU 3031899 A | 11-10-1999 |
| | | | CN 1292687 T | 25-04-2001 |
| | | | WO 9947130 A1 | 23-09-1999 |
| | | | EP 1061904 A1 | 27-12-2000 |
| | | | JP 2002506814 T | 05-03-2002 |
| EP 0681834 | A | 15-11-1995 | EP 0681834 A1 | 15-11-1995 |
| | | | DE 59408989 D1 | 13-01-2000 |
| | | | DK 681834 T3 | 29-05-2000 |
| | | | ES 2143513 T3 | 16-05-2000 |
| | | | GR 3032897 T3 | 31-07-2000 |
| WO 0209864 | A | 07-02-2002 | DE 10037707 A1 | 14-02-2002 |
| | | | DE 10050382 A1 | 18-04-2002 |
| | | | WO 0209864 A1 | 07-02-2002 |
| | | | WO 0209865 A1 | 07-02-2002 |
| | | | AU 1501502 A | 22-04-2002 |
| | | | WO 0231092 A2 | 18-04-2002 |
| WO 0231092 | A | 18-04-2002 | DE 10050382 A1 | 18-04-2002 |
| | | | AU 1501502 A | 22-04-2002 |
| | | | WO 0209864 A1 | 07-02-2002 |
| | | | WO 0209865 A1 | 07-02-2002 |
| | | | WO 0231092 A2 | 18-04-2002 |

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06001

IPK 7 B01J13/02 A61K8/11 A61K9/50 A61K9/51 C11D3/50

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

IPK 7 B01J A61K C11D

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | DE 198 10 965 A (AVENTIS RES & TECH GMBH & CO) 16. September 1999 (1999-09-16) das ganze Dokument | 1-7,9-11 |
| A | EP 0 681 834 A (VOGT WALTER DR ;POMMERSHEIM RAINER (DE); SCHREZENMEIR JUERGEN (DE)) 15. November 1995 (1995-11-15) das ganze Dokument | 1-16 |

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

10/10/2002

Willsher, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06001

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|---------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | <p>WEN S ET AL: "Microcapsules through polymer complexation - Part 3: encapsulation and culture of human Burkitt lymphoma cells in vitro"</p> <p>BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Bd. 16, Nr. 4, 1995, Seiten 325-335, XP004033057 ISSN: 0142-9612 das ganze Dokument</p> | 1-16 |
| A | <p>MEYENBURG S ET AL: "Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system - Studies on the in vitro release behavior"</p> <p>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 69, Nr. 1, 3. Oktober 2000 (2000-10-03), Seiten 159-168, XP004217542 ISSN: 0168-3659 das ganze Dokument</p> | 1-16 |
| P,X | <p>WO 02 09864 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;SEIBT HORST (DE); VOIGT ANDREAS (DE); ANT) 7. Februar 2002 (2002-02-07) Seite 7, Zeile 30 -Seite 7, Zeile 31; Ansprüche 1,4-8,11,22</p> | 1,2,10, 11,14 |
| P,X | <p>WO 02 31092 A (RYBINSKI WOLFGANG ;HENKEL KGAA (DE); KRUPP UTE (DE); MEIER FRANK ()) 18. April 2002 (2002-04-18) Seite 10, Zeile 24 -Seite 10, Zeile 25; Ansprüche 1,3,6,8,11,15,24-27</p> | 1,2,10, 11,14,15 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06001

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19810965 A | 16-09-1999 | DE 19810965 A1 | 16-09-1999 |
| | | AU 3031899 A | 11-10-1999 |
| | | CN 1292687 T | 25-04-2001 |
| | | WO 9947130 A1 | 23-09-1999 |
| | | EP 1061904 A1 | 27-12-2000 |
| | | JP 2002506814 T | 05-03-2002 |
| EP 0681834 A | 15-11-1995 | EP 0681834 A1 | 15-11-1995 |
| | | DE 59408989 D1 | 13-01-2000 |
| | | DK 681834 T3 | 29-05-2000 |
| | | ES 2143513 T3 | 16-05-2000 |
| | | GR 3032897 T3 | 31-07-2000 |
| WO 0209864 A | 07-02-2002 | DE 10037707 A1 | 14-02-2002 |
| | | DE 10050382 A1 | 18-04-2002 |
| | | WO 0209864 A1 | 07-02-2002 |
| | | WO 0209865 A1 | 07-02-2002 |
| | | AU 1501502 A | 22-04-2002 |
| | | WO 0231092 A2 | 18-04-2002 |
| WO 0231092 A | 18-04-2002 | DE 10050382 A1 | 18-04-2002 |
| | | AU 1501502 A | 22-04-2002 |
| | | WO 0209864 A1 | 07-02-2002 |
| | | WO 0209865 A1 | 07-02-2002 |
| | | WO 0231092 A2 | 18-04-2002 |